

Transduktion bei *Rhizobium lupini*

von

Alfons Rösch

aus

Passau

1973
—

1973 # 433



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548407_0043

Transduktion bei *Rhizobium lupini*

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt

von

Alfons Rösch

aus

Passau

Als Dissertation genehmigt
von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung: 28. November 1973

Dekan:	Universitätsprofessor Dr. J.Christiansen
Berichterstatter:	Universitätsprofessor Dr. W.Heumann
Berichterstatter:	Universitätsprofessor Dr. H.zur Hausen

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A) <u>Zusammenfassung</u>	2
B) <u>Einleitung</u>	3
C) <u>Material und Methoden</u>	5
1) Bakterienstämme	5
2) Medien	6
3) Biochemikalien	6
4) Isolierung der DNA aus dem R. lupini Stamm 1-766 und Transformationstest	6
5) Anreicherung und Nachweis des transferierenden Agens	7
6) Gewinnung von Phagen	7
7) Transduktionstest	8
8) CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation	8
9) Sucrosegredienten-Zentrifugation	9
10) Elektronenmikroskopische Präparation	9
D) <u>Ergebnisse</u>	10
1) Versuche zur Transformation	10
2) Prüfung des Kulturfiltrates	10
3) Eigenschaften des transferierenden Agens	10
a) enzymatischer Test	10
b) Temperatur-Test	11
c) Sedimentationstest	11
4) Versuche zur Transduktion	11
a) Phagen-Nachweis und -Isolation	11
b) Reinigung der Phagenanreicherung in einem CsCl-Dichtegradienten	12
c) Reinigung der Phagenanreicherung über einen Sucrosegredienten	13
d) Transfer verschiedener genetischer Markierungen	13
e) Prophagen-Induktion	14
5) Elektronenmikroskopische Charakterisierung des Phagen	15
E) <u>Diskussion</u>	30
F) <u>Literaturverzeichnis</u>	34

Zusammenfassung

In dem durch Konjugationsanalysen genetisch gut untersuchten Bakterium Rhizobium lupini wurde Transduktion durch den Bakteriophagen ϕ -1 als weiteres Transfersystem nachgewiesen. Dieser Phage ist induzierbar, er verursacht allgemeine Transduktion. Er ist jedoch in keiner von 88 getesteten Wirtsmutanten zur Plaquebildung befähigt. Die Phagensuspension wurde im Sucrosegradienten angereichert und gereinigt; die Fraktionen maximaler genetischer Aktivität enthalten ausschließlich die Phagen. Die morphologischen Daten der Partikel wurden festgestellt.

Einleitung

Innerhalb der Bakteriengruppe Rhizobium wurde die Übertragung bakterieller Gene durch Konjugation von HEUMANN (10) für Rhizobium lupini beschrieben. Konjugation findet durch Zellkontakt zwischen Donor- und Rezipientenzellen statt. Dabei übertragen die Donorzellen eine bestimmte Chromosomenregion auf die Rezipienten. Das R. lupini-Chromosom besteht aus zwei Regionen, c- und d-Region, die unabhängig voneinander transferiert werden und deren Übertragung durch die Fertilitätsdeterminanten Fc und Fd bestimmt werden (9, 10, 11). Mutanten mit dem Fertilitätscharakter $Fc^- Fd^-$ können keine der beiden Regionen übertragen und stellen reine Konjugationsrezipienten dar.

Im Zuge dieser Untersuchungen wurde jedoch festgestellt, daß es in manchen Fällen zu einem Genaustausch zwischen diesen Rezipientenzellen kommt. Diese unerwartete Rekombinantenbildung muß also auf ein von der Konjugation unabhängiges Transfersystem zurückgeführt werden.

Neben der Konjugation sind als Gentransfer-Mechanismen bei Bakterien Transformation (Gentransfer durch isolierte Desoxyribonukleinsäure, DNA) und Transduktion (Transfer bakterieller Gene durch Phagen) bekannt. (1, 8)

Während in der Literatur eine Transformation genetischer Markierungen bei verschiedenen Rhizobium-Arten beschrieben wurde (2, 6, 20, 21), gibt es nur einen Hinweis auf Transduktion und zwar bei Rhizobium meliloti (13).

In der vorliegenden Arbeit wird die Alternative Transformation oder Transduktion zugunsten der letzteren entschieden und das Transduktionssystem näher untersucht.

Material und Methoden

1) Bakterienstämme

Als Ausgangsstämme für diese Untersuchungen dienten Rhizobium lupini 1-766 cys L, str^r, car-1, Fc⁻Fd⁻ und 1-777-1 pro(glu), str^s, car-ctr, Fc⁻Fd⁻. Der Stamm 1-777-1 wurde aus einer prototrophen Revertante von 1-777 (cysL, str^s, car-ctr, Fc⁻Fd⁻) nach Nitrit-Mutagenese (16) isoliert. Die beiden Mutanten 1-766 und 1-777 gehen wie alle anderen weiter unten aufgeführten Stämme auf den gemeinsamen Wildtypstamm 1-99 (9) zurück. Sie wurden über mehrere Mutageneseschritte erhalten.

<u>Abkürzungen:</u>	ade	= Auxotrophie für Adenin
	arg	= Auxotrophie für Arginin
	car	= Carotinoid-Region
	ctr	= zitronenfarbig
	cys	= Auxotrophie für Cystein
	Fc ⁻	= keine Übertragung der c-Region
	Fd ⁻	= keine Übertragung der d-Region
	ilv	= Auxotrophie für Isoleucin und Valin
	l	= weiß (leukos)
	met	= Auxotrophie für Methionin
	od ₆₅₀	= optische Dichte, gemessen bei 650 nm
	pro	= Auxotrophie für Prolin
	pro(glu)	= die Prolin-Auxotrophie kann auch durch Glutaminsäure (Glu) supplementiert werden
	str	= Streptomycin, r = resistent s = sensitiv

2) Medien

a) NB (Vollmedium): 8 g nutrient broth DIFCO
pro 1.000 ml dest. Wasser

b) MM (Minimalmedium): HEUMANN (9)

c) MM+NB: Minimalmedium mit 1 % NB

Für Festmedien (NB-, MM-Agar) gibt man pro 1.000 ml
Medium 18 g Bacto-Agar DIFCO zu.

d) PS (Puffer-Saline): 7 g Na_2HPO_4
3 g KH_2PO_4
5 g NaCl ad 1.000 ml dest. Wasser
pH 7.

3) Biochemikalien

Desoxyribonuklease I (DNase I, pankr.) lyophil. rein,
SERVA Heidelberg

Ribonuklease, pankr. (RNase I), reinst,
SERVA Heidelberg

Pronase P, lyophil., reinst, SERVA Heidelberg

Mitomycin C, pharm., SERVA Heidelberg

Caesiumchlorid CsCl , suprapur, MERCK Darmstadt

Saccharose (Sucrose), reinst, MERCK Darmstadt

Polyäthylenglykol 6000 (PEG), pract., SERVA Heidelberg

4) Isolierung der DNA aus dem R. lupini-Stamm 1-766 und Transformationstest

Stamm R. lupini 1-766 (Donor) wurde in NB bis zu einer
optischen Dichte (OD_{650}) von 0,8-0,9 angezogen. Anschließend
wurden die Zellen 5 min. bei 10.000 x g abzentrifugiert
und gewaschen. Die DNA-Isolierung erfolgte sowohl nach
KIRBY (12) als auch MARMUR (14).

Eine NB-Kultur von 1-777-1 (Rezipient) wurde in verschiedenen Wachstumsphasen mit jeweils 10 µg/ml DNA des Donorstammes 1-766 versetzt ($OD_{260} = 0,1$ entspricht 1 µg/ml DNA) und 1 h bei 30 °C inkubiert; anschließend wurden 0,1 ml des DNA-Zellgemisches zum Test auf Bildung prototropher bzw. Str-resistenter Transformanten auf MM- bzw. NB+Str-Agar ausgespatelt und 6 bis 8 Tage bei 30 °C bebrütet.

5) Anreicherung und Nachweis des transferierenden Agens

Die R. lupini-Mutante 1-766 wurde in 3 l NB 2-3 Tage kultiviert. Nach Abzentrifugation der Zellen wurde der Überstand in einem BÜCHI-Rotationsverdampfer (COLORA Lorch/M.) auf 1/20 eingengt und sterilfiltriert (0,45 µm Membranfilter, SARTORIUS Göttingen). Das so angereicherte Medium wurde F_{NB} bezeichnet.

0,5 ml einer wachsenden bzw. frühstationären NB-Kultur von 1-777-1 wurden nach Zugabe von 0,5 ml F_{NB} gleichmäßig auf MM-Agar verteilt. Nach 18 h Inkubation bei 30 °C wurde der Bakterienrasen mit dest. Wasser abgeschwemmt und niedrigtourig abzentrifugiert. 0,01 ml dieses Zentrifugates wurden auf MM-Agar zum Nachweis prototropher Rekombinanten ausplattiert und bebrütet. Als Kontrolle diente NB-Medium.

6) Gewinnung der Phagen

Der R. lupini-Stamm 1-766 wurde in 6 Erlenmeyerkolben mit je 500 ml NB angezogen und durch Einblasen steriler Luft belüftet. Nach 3 bis 4 Tagen Inkubation bei 30 °C erfolgte die Abzentrifugation der Zellen (10 min. bei

10.000 x g) mit anschließender Phagenanreicherung nach YAMAMOTO et al. (19) aus dem überstehenden Kulturmedium; hierzu wurde das Medium mit 0,5 M-NaCl und 10 % PEG-6000 (Endkonzentration) versetzt. Nach ca. 12 Stunden Stehenlassen bei 4 °C wurde der Phagen-enthaltende Niederschlag 10 min. bei 10.000 x g abzentrifugiert und dann in wenigen ml PS suspendiert. Zur Entfernung des PEG erfolgte eine zweite, hochtourige Zentrifugation (6 h bei 100.000 x g), deren Sediment dann in 2 ml PS resuspendiert und durch Membranfilter (0,45 µm) sterilfiltriert wurde. Die Phagensuspension wurde über wenigen Tropfen Chloroform im Kühlschrank aufbewahrt.

7) Transduktionstest

Die Rezipientenstämme wurden in NB bei 30 °C bis zu einer optischen Dichte (OD_{650}) von 0,8-0,9 angezogen, 10 ml dieser Kultur 5 min. bei 9.000 x g zentrifugiert und das resultierende Sediment in 1 ml PS aufgenommen. 0,2 ml dieser Suspension wurden mit gleichem Teil Phagenanreicherung vermischt, nach 30 min. zum Nachweis protothropher Transduktanten auf MM+NB-Agar ausplattiert (0,1 ml/Platte).

8) CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation

Der CsCl-Dichtegradient bestand aus 2,72 g CsCl und 5 ml Phagensuspension (Eingangsdichte 1,35 g/cm³). Die Zentrifugation erfolgte bei 36.000 Upm über 60 Stunden (25 °C) in einem SW 3x5 Rotor (PK-50 Ultrazentrifuge, WKF Darmstadt). Der Gradient wurde nach Anstechen des Röhrchenbodens in

6-Tropfen-Fraktionen gesammelt und deren UV-Absorption bei 260 nm in einem PMQ II Spektralphotometer (ZEISS Oberkochen) nach Zugabe von 1 ml PS pro Fraktion gemessen. Die Bestimmung der Dichte des Gradienten (aus einem Parallelröhrchen ohne Phagenkonzentrat) erfolgte refraktometrisch über den Brechungsindex. Zur Umrechnung wurde die Formel von WEIGLE et al. (18) verwendet:

$$\sigma^{20} = 10,860 n_D^{25} - 13,500$$

Jede Fraktion wurde mit Hilfe des oben beschriebenen Transduktionstests auf ihre genetische Aktivität geprüft.

9) Sucrosegradienten-Zentrifugation

29 ml eines linearen, neutralen Sucrosegradienten von 5-40 % (w/v) in PS wurden mit 1 ml Phagenanreicherung überschichtet, 4 Stunden bei 25.000 Upm zentrifugiert und anschließend in 30-Tropfen-Fraktionen gesammelt. Die Messung der genetischen Aktivität erfolgte auch hier durch den oben angeführten Transduktionstest.

10) Elektronenmikroskopische Präparation

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden die Proben nach der Methode von VALENTINE et al. (17) präpariert. Die Negativ-Kontrastierung (4) erfolgte mit 2 %iger Phosphorwolframsäure pH 7 oder 2 %igem Uranylacetat. Die elektronenmikroskopischen Bilder wurden mit einem JEM 7 A Gerät (JEOL, Japan) aufgenommen.

Ergebnisse

1) Versuche zur Transformation

In den in der Einleitung erwähnten konjugationsunabhängigen Transferexperimenten war für den Stamm 1-766 Donorfunktion nachgewiesen worden. Um zu untersuchen, ob diese Eigenschaft auf Transformation beruht, wurde die DNA dieses Stammes auf ihre transformierende Aktivität geprüft. Sie wurde mit Phenol oder Chloroform-Isopentanol (12, 14) extrahiert und auf ihre Transformierbarkeit getestet (s. Material und Methoden Nr. 4). Es zeigte sich, daß der Anteil prototropher Zellen des auxotrophen Rezipientenstammes 1-777-1 durch die Behandlung mit 1-766 DNA nicht über den Kontrollwert von 10-15 Kolonien pro Platte erhöht wurde. Transformation wurde hierdurch ausgeschlossen.

2) Prüfung des Kulturfiltrates

Da also molekulare DNA als genetisch aktives Agens aus-
schied, wurde das Kulturmedium auf seine genetische Aktivität geprüft: eine Behandlung der Rezipientenzellen mit dem 1:20 eingeeengten Filtrat (F_{NB}) ergab 2.000 bis 3.000 prototrophe bzw. Str-resistente Rekombinanten pro 0,1 ml Ausgangs- F_{NB} .

3) Eigenschaften des transferierenden Agens

a) enzymatischer Test: das genetisch aktive Filtrat F_{NB} wurde mit DNase, RNase und Pronase behandelt. Tabelle 1 (Seite 17) zeigt, daß die Gentransfer-Aktivität resistent gegen Nukleasen und sensitiv gegen das proteolytische Enzym ist.

b) Temperatur-Test: eine weitere Eigenschaft des transferierenden Agens ist das labile Verhalten bei erhöhter Temperatur. Wie man aus Abb. 1 (Seite 18) ersieht, genügte ein zweiminütiges Erhitzen auf 60 °C, um die genetische Aktivität auf 10 % (von 850 auf 84 Kolonien) zu reduzieren.

c) Sedimentationstest: durch differenziertes, hochtouriges Zentrifugieren konnte weiterhin festgestellt werden, daß die transferierende Aktivität im F_{NB} bereits bei 20.000 Upm (= 44.000 x g) zu 77,5 % sedimentiert (Tabelle 2, Seite 19).

Die Eigenschaften des Kulturfiltrates indizieren Phagen als das genetisch aktive Agens. F_{NB} wurde daher auf Phagen untersucht.

4) Versuche zur Transduktion

a) Phagen-Nachweis und -Isolation

Von dem Kulturmedium des R. lupini-Stammes 1-766 wurde ein Phagenpräparat (s. Material und Methoden Nr. 6) hergestellt und dann auf seine Gentransfer-Aktivität mit dem Rezipientenstamm 1-777-1 getestet. 0,05 ml einer 1:10 Verdünnung des Präparates ergaben durchschnittlich 1.000 bis 2.000 prototrophe Rekombinanten mit der Farbe (ctr) des Rezipienten.

Weiterhin wurde die Phagenanreicherung auf das Vorhandensein Plaque-bildender Partikel hin geprüft. Hierzu wurden NB-Platten mit 2,5 ml NB-Weichagar und 0,2 ml einer 1:10 verdünnten Übernachtskultur (NB) 88 verschiedener Rezipientenstämme von R. lupini (als mögliche Phagen-

Indikatoren) überschichtet. Die Platten wurden anschließend mit Phagensuspension betropft und 1 Tag bei 30 °C bebrütet. Von diesen 88 untersuchten R. lupini-Stämmen zeigte keiner Plaques oder Hemmzonen an.

Der Nachweis des Phagen gelang jedoch mit Hilfe des Elektronenmikroskops (Abb. 2, Seite 20). Die Morphologie dieses als "φ-1" bezeichneten Phagen wird weiter unten beschrieben.

b) Reinigung der Phagenanreicherung in einem CsCl-Dichtegradienten

Da das Rohpräparat von φ-1 neben Phagen noch verunreinigende Zellbestandteile enthielt, war eine Zuordnung der Phagen zur biologisch-genetischen Aktivität noch nicht eindeutig möglich. Deshalb wurde das Phagenkonzentrat durch einen CsCl-Dichtegradienten gereinigt. Die Graphik in Abb. 3 (Seite 21) zeigt das Ergebnis einer CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation des Phagenkonzentrates. Die Messung der UV-Absorption bei 260 nm erbrachte ein mehr oder minder deutliches Maximum bei einer Dichte von 1,426 g/cm³ (Fraktion 18-20), das auch mit dem Maximum an genetischer Aktivität zusammenfiel. Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Fraktionen 18-20 bestätigte die Anreicherung der Phagenpartikel und Trennung von den übrigen Zelltrümmern (Abb. 4, Seite 22).

Die Ausbeute an Rekombinantenkolonien war jedoch im Vergleich zur Menge an eingesetztem Phagenkonzentrat unerwartet niedrig. Da mit 0,05 ml einer 1:10 verdünnten

Phagensuspension im Transduktionstest (s. oben) bereits 1.000 - 2.000 Rekombinantenkolonien erzielt wurden, sollte bei diesem Versuch die Aktivität in den getesteten Fraktionen von insgesamt 5 ml Phagenanreicherung (das 1.000-fache, also ca. 30.000 Kolonien) zu erwarten sein. Die maximale Ausbeute betrug in Fraktion 19 jedoch nur 30 Kolonien pro Platte.

c) Reinigung der Phagenanreicherung über einen Sucrosegradienten

In einem weiteren Versuch wurden die Phagen von 1-766 über einen Sucrosegradienten von 5-40 % gereinigt. In Abb. 5 (Seite 23) ist das Ergebnis des Sucrose-Laufes dargestellt. Die genetische Aktivität ist auf wenige Fraktionen beschränkt. Die Anzahl an prototrophen Rekombinanten entspricht der erwarteten Menge, die jedoch etwas geringer sein mußte als im CsCl-Gradienten, da nur 1/5 des oben eingesetzten Volumens an Phagensuspension zentrifugiert worden war.

Die Überprüfung der aktiven Fraktionen im Elektronenmikroskop ergab eine eindeutige Zuordnung der Phagen zum Aktivitätsmaximum. Es lassen sich nämlich nur in den Fraktionen 17-20 ϕ -1 Phagen nachweisen (Abb. 6, Seite 24). Damit wird deutlich, daß die gesamte genetische Aktivität auf Phagen zurückgeführt werden kann.

d) Transfer verschiedener genetischer Markierungen

Von 88 geprüften R. lupini-Mutanten waren 14 mit ϕ -1 transduzierbar (s. Material und Methoden Nr. 7). In

Tabelle 3 (Seite 25) sind 6 Stämme mit verschiedenen auxotrophen Markierungen aufgeführt, welche mit ϕ -1 zur Prototrophie transduziert wurden; die übrigen 8 aktiven Rezipienten wurden zur Streptomycin-Resistenz (str) transduziert.

Die Transduktionsrate (Verhältnis von Transduktanten zur Anzahl Rezipientenzellen) liegt zwischen 5×10^{-6} und 6×10^{-9} . Die Markierungen sind über das gesamte R. lupini-Chromosom verteilt: pro, arg, met, ilv liegen in der d-Region und cys, str in der c-Region (9, 10, 11).

e) Prophagen-Induktion

Bisher wurden die Phagenpartikel in einem 3-4 Tage alten Kulturfiltrat des Donorstammes 1-766 nachgewiesen. Offenbar wird ϕ -1 vom lysogenen Bakterium 1-766 durch spontane Lyse freigesetzt. Die Frage liegt nahe: Läßt sich ϕ -1 bereits aus wachsenden Zellen induzieren? Geprüft wurde Induktion durch UV und Mitomycin C. Wachsende Kulturen von 1-766 wurden mit UV verschiedene Zeiten mit $10 \text{ erg/mm}^2/\text{sec}$ oder mit Mitomycin C ($1 \mu\text{g/ml}$) behandelt.

Zur UV-Induktion wurde der Stamm 1-766 in NB bis zu einer optischen Dichte (OD_{650}) von 0,6-0,8 angezogen und dann in PS gewaschen. Nach verschieden langer Bestrahlungszeit mit UV (0 bis 200 sec) wurden die Zellen 18 h in frischem NB weiter inkubiert. Die aus dem Kulturmedium durch Ultrazentrifugation gewonnenen Phagen wurden auf ihre Gentransfer-Aktivität hin getestet (s. Material und Methoden Nr. 7).

Durch eine UV-Bestrahlung der ϕ -1 lysogenen Bakterien von 120 sec wurde die Produktion genetischer Aktivität

auf das 4,5-fache des Spontanwertes gesteigert (Tabelle 4, Seite 26). Bei längerer Belichtungszeit als 120 sec nahm die Produktion wieder ab, da die Zellen von 1-766 um mehr als 50 % inaktiviert wurden.

Zur Induktion mit Mitomycin C wurden logarithmisch-wachsende Zellen von 1-766 mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Mitomycin C in NB versetzt. Nach verschiedenen Zeiten wurde das Antibiotikum aus dem Kulturmedium durch Zentrifugieren entfernt und die Zellen in frischem NB 18 h weiter inkubiert. Danach wurden die Phagen aus dem Kulturmedium durch hochtourige Zentrifugation gewonnen. Tabelle 5 (Seite 27) zeigt, daß nach 3-stündiger Mitomycin C-Einwirkung die genetische Aktivität ebenfalls um etwa das 4-fache anstieg.

5) Elektronenmikroskopische Charakterisierung des Phagen ϕ -1

Wie aus den Abbildungen 2, 4, 6 und 7 zu ersehen ist, besteht der Phage ϕ -1 aus einem Kopf mit hexagonalem Grundriß und einem nicht-kontrahierbaren Schwanz. Die Ausmessungen von etwa 90 Phagenpartikel ergaben folgende Werte:

Kopfdurchmesser	$33,2 \pm 1,9 \text{ nm}$
Schwanzlänge	$37,8 \pm 5,5 \text{ nm}$
Schwanzdurchmesser	$7,7 \pm 0,8 \text{ nm}$

Der Schwanz geht an seiner Basis in mindestens zwei Fasern mit einer Länge von ca. 16 nm über (Abb. 7, Seite 28). Nach Kontrastierung mit Uranylacetat (pH 4,5) erscheint der Phagenkopf in der Regel leer, und im Schwanz wird eine innere Röhre (Durchmesser ca. 2,2 nm) sichtbar (kleine

Doppelpfeile in Abb. 2, Seite 20). In Präparationen mit Phosphorwolframsäure (pH 7) dagegen findet man vorwiegend volle Köpfe (Abb. 4, Seite 22).

Abb. 8 (Seite 29) zeigt, daß ϕ -1 Phagen an die Zellen des Rezipientenstammes 1-777-1 adsorbieren können. Die Zellen wurden vor der elektronenmikroskopischen Präparation gewaschen, damit nicht-adsorbierte Phagen von den Zellen abgeschwemmt werden. Bei dieser Präparation konnten nur sehr selten frei vorliegende Phagen beobachtet werden.

Aufgrund der Partikeldichte im elektronenmikroskopischen Präparat kann die Suspensionsdichte der Phagen in der durch Induktion gewonnenen Anreicherung geschätzt werden; sie beträgt 10^9 bis 10^{10} Phagen /ml (3).

Tab. 1 Nukleasen- und Pronase-Behandlung des Filtrates F_{NB}

F _{NB} behandelt mit	Anzahl an Rekombinanten
unbehandelte Kontrolle	1170 / 0,1 ml F _{NB}
DNase (100 µg/ml)	870 / "
RNase (50 µg/ml)	820 / "
Pronase (1 mg/ml)	5 / "

F_{NB} wurde mit dem jeweiligen Enzym über Nacht bei 30 °C inkubiert und anschließend auf seine genetische Aktivität getestet.



Abb. 1 Hitzeempfindlichkeit des transferierenden Agens:
3,5 ml F_{NB} wurden in 60 °C warmes Wasserbad ge-
stellt. Nach den angegebenen Zeiten wurden Proben
entnommen, schnell abgekühlt und auf ihre gene-
tische Aktivität hin getestet.

Tab. 2 Sedimentation der Gentransfer-Aktivität

F_{NB} zentrifugiert bei	Anzahl an prototrophen Rekombinanten/0,05 ml F_{NB}	% der Gesamtaktivität
20.000 Upm (44.000 x g)	110	77,5
25.000 Upm (68.000 x g)	30	21,1
30.000 Upm (99.000 x g)	0	0
Überstand von 30.000 Upm	2	1,4

5 ml F_{NB} wurden 6 h bei 20.000 Upm zentrifugiert, der Überstand davon 6 h bei 25.000 Upm und dieser Überstand nochmals 6 h bei 30.000 Upm zentrifugiert. Das jeweilige Sediment wurde in 5 ml NB resuspendiert und alle vier Proben auf ihre genetische Aktivität geprüft.

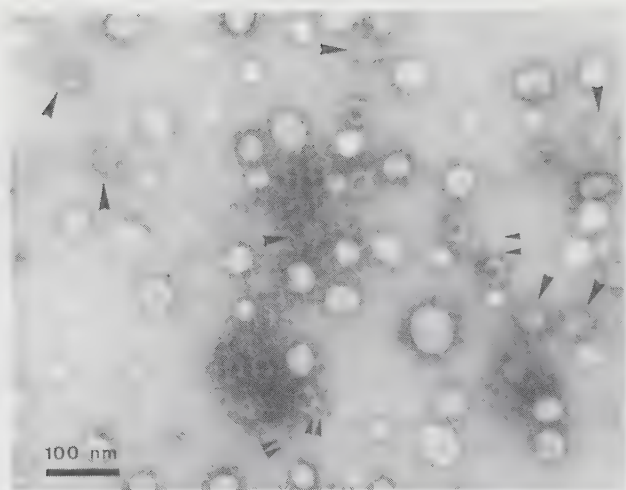


Abb. 2 Elektronenmikroskopische Aufnahme einer ϕ -1 Anreicherung aus dem Kulturmedium von Rhizobium lupini Stamm 1-766. Die großen Pfeile weisen auf ϕ -1 Phagen mit vollen Köpfen hin; die kleinen Doppelpfeile zeigen auf Phagen mit leeren Köpfen und sichtbarer innerer Schwanzröhre. Negativ-Kontrastierung mit 2 % Uranylacetat.

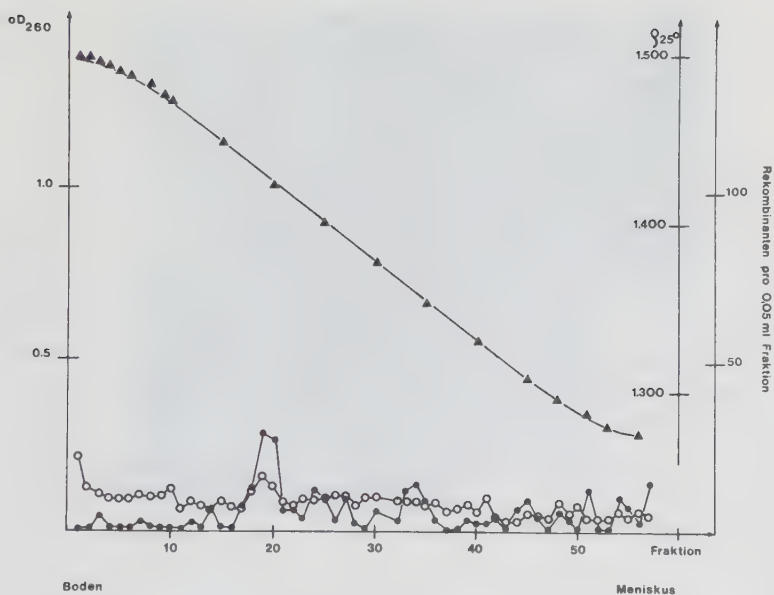


Abb. 3 Verteilung der Gentransfer-Aktivität eines ϕ -1 Konzentrates in einem CsCl-Gradienten (Δ).
 (●) Anzahl der Rekombinanten pro 0,05 ml Fraktion,
 (○) optische Dichte bei 260 nm.

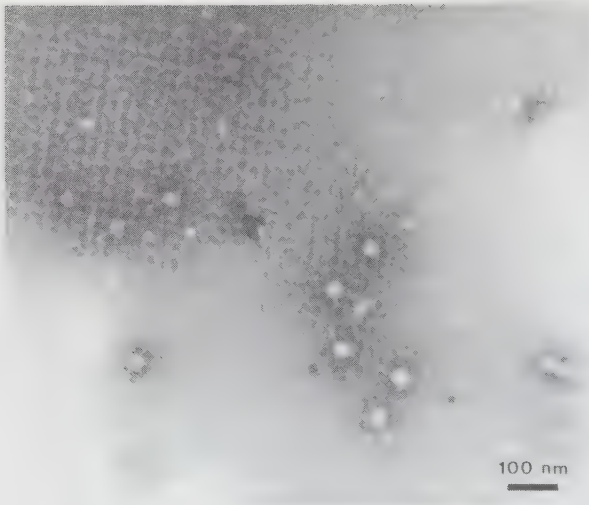


Abb. 4 Elektronenmikroskopische Aufnahme aus
Fraktion 18 des CsCl-Gradienten von Abb. 3.
Negativ-Kontrastierung mit 2 % Phosphor-
wolframsäure.

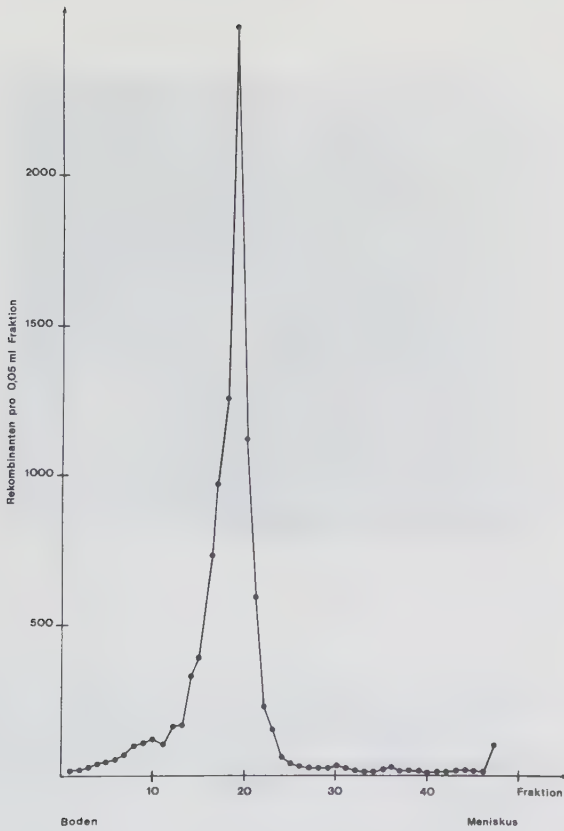


Abb. 5 Verteilung der genetischen Aktivität einer ϕ -1 Anreicherung nach Zentrifugation in einem 5-40 % Sucrose-Gradienten.

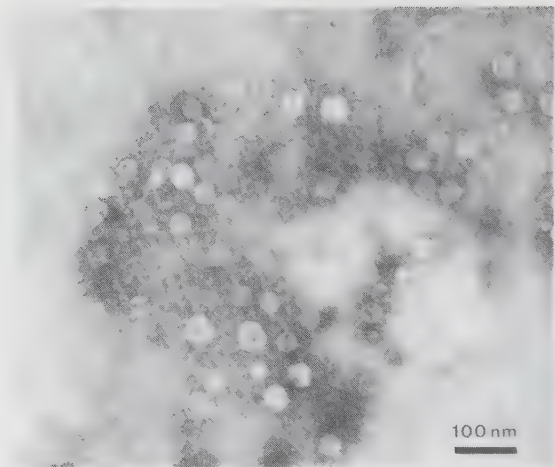


Abb. 6 Elektronenmikroskopisches Bild der ϕ -1 Phagen aus Fraktion 19 des Sucrosegradienten von Abb. 5. Negativ-Kontrastierung mit 2 % Phosphorwolframsäure.

Tab. 3 Transfer verschiedener genetischer Markierungen
(Transduktion zur Prototrophie)

Stamm-Nr.	Genotyp der auxotrophen Rezipienten	Transduktionsrate ^{x)}
1-777-1	pro(glu), car-ctr	$5,2 \times 10^{-6}$
1-777-19	ilv, car-ctr	2×10^{-8}
1-721	met H, car-ctr	$1,3 \times 10^{-6}$
1-722	arg E, car-ctr	$1,3 \times 10^{-7}$
1-723	pro A, car-ctr	$6,2 \times 10^{-7}$
1-748	cys H, car-ctr	6×10^{-9}

x) Die Transduktionsrate ist aus dem Verhältnis der Anzahl an prototrophen Rekombinanten zur Anzahl an eingesetzten Rezipientenzellen berechnet.

Die Zellsuspension wird 1:1 mit Phagensuspension gemischt und 0,1 ml auf MM+NB-Agar ausgespatelt. Gleichzeitig wurde der Lebendtitel der gesamten Zellen durch Ausplattieren einer Verdünnungsreihe auf NB-Agar bestimmt.

Tab. 4 Induktion des ϕ -1 Prophagen durch UV-Licht

Bestrahlungszeit	Anzahl der prototrophen Rekombinanten	Steigerung durch Induktion
0 sec	440 / 0,05 ml	
40 sec	1640 / "	x 3,7
80 sec	1780 / "	x 4
120 sec	1960 / "	x 4,5
160 sec	1700 / "	x 3,9
200 sec	1610 / "	x 3,7

Log-Zellen von 1-766 wurden in PS-Puffer mit UV ($10 \text{ erg/mm}^2/\text{sec}$) bestrahlt und 10 ml in 100 ml frischem NB 18 h inkubiert. Die Phagen wurden aus dem Medium durch hochtourige Zentrifugation gewonnen und ihre genetische Aktivität mit Hilfe des Transduktionstests bestimmt.

Tab. 5 Induktion des ϕ -1 Prophagen mit Mitomycin C

Inkubationszeit mit Mitomycin C	Anzahl an prototrophen Rekombinanten	Steigerung durch Induktion
0 h	90 / 0,05 ml	
0,5 h	220 / "	x 2,4
1 h	220 / "	x 2,4
3 h	350 / "	x 3,9
5 h	315 / "	x 3,5
7 h	165 / "	x 1,8

100 ml einer logarithmisch-wachsenden NB-Kultur von 1-766 wurden zum Zeitpunkt 0 mit 1 μ g/ml Mitomycin C versetzt. Nach verschieden langer Inkubation wurden 10 ml Kultur zur Entfernung des Mitomycin C zentrifugiert und die Zellen in 100 ml frischem NB 18 h weiter inkubiert. Zentrifugation und Transduktionstest wie für Tab. 4.

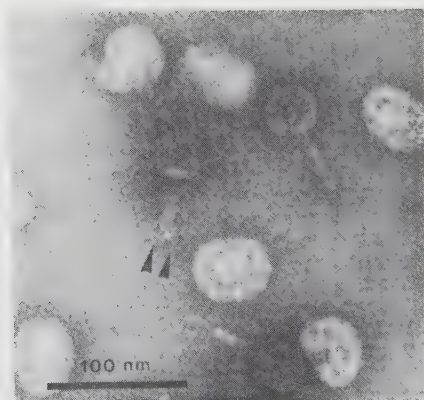


Abb. 7 Elektronenmikroskopisches Bild des Phagen ϕ -1 mit deutlich sichtbaren Schwanzfasern (Pfeile).
Negativ-Kontrastierung mit 2 % Uranylacetat.

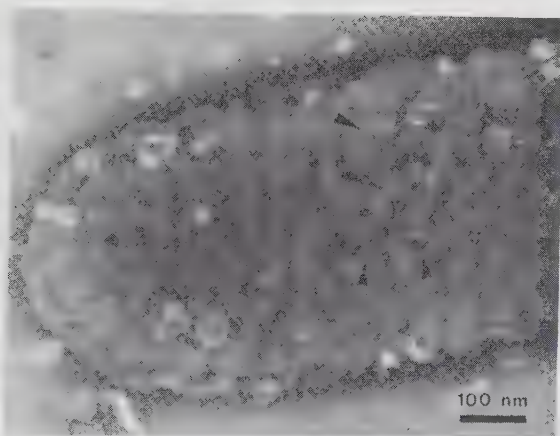


Abb. 8 Adsorbierte ϕ -1 Phagen an eine Zelle des Rezipientenstammes 1-777-1 von R. lupini.
(Pfeile)

Die Zellen einer wachsenden Kultur von 1-777-1 wurden gewaschen und in PS resuspendiert. Eine Mischung aus 0,5 ml Zellsuspension und 0,5 ml Phagensuspension wurden 1 h bei 30 °C inkubiert, mit PS gewaschen und anschließend wie auf Seite 8 präpariert.

Negativ-Kontrastierung mit 2 % Phosphorwolframsäure.

Diskussion

Die Untersuchung des Transferprozesses bei der Konjugation von Rhizobium lupini durch verschiedene Donor-mutanten (10, 11) hatte u.a. gezeigt, daß in diesem System neben Konjugation noch ein anderer, konjugationsunabhängiger Mechanismus des Genaustausches wirksam ist. Nach allem, was über Bakteriengenetik bekannt ist, blieb zur Entscheidung nur Transformation oder Transduktion übrig. Es war die Aufgabe vorliegender Arbeit, diese Alternative zu entscheiden und das gefundene Transfersystem näher zu beschreiben.

Da in der Literatur verschiedene Hinweise auf Transformation bei Rhizobium gegeben sind (2, 6, 20, 21), wurde zunächst auf Transformation getestet, jedoch ohne Erfolg: isolierte Rhizobium-DNA blieb völlig inaktiv und das beobachtete Transfersystem war resistent gegen Nukleasen. Erfolgreich hingegen war die Suche nach transduzierenden Bakteriophagen. Sie führte zur Definierung eines transduzierenden Systems, das sich, soweit aus den vorliegenden Ergebnissen ersichtlich ist, von den bekannten Transduktionsmechanismen (15) unterscheidet. Aus dem Kulturmedium des R. lupini-Stammes 1-766, der bis zur Stationärphase durchgewachsen war, wurden Phagen, ϕ -1 genannt, angereichert, die als das gesuchte Agens der Übertragung bakterieller Gene identifiziert wurden. da die Transduktion sieben verschiedener Markierungen des Bakteriengenoms

durch ϕ -1 nachgewiesen werden konnte, wurde er in die Gruppe der allgemein transduzierenden Phagen eingeordnet. Bei einer Partikeldichte von 10^9 bis 10^{10} /ml erhalten wir mit 0,05 ml Phagensuspension (10^{-1} verdünnt) 10^2 bis 10^3 Rekombinanten. Die Transduktionsrate für ein bestimmtes Gen liegt also zwischen 10^{-6} und 10^{-4} .

Die Transduktionsfähigkeit von ϕ -1 ist resistent gegen DNase und RNase, jedoch sensitiv gegen das proteolytische Enzym Pronase, sowie gegen kurzes Erwärmen auf 60°C . Transduzierende Partikel werden durch die Mutante 1-766 spontan in der Stationärphase, offenbar durch Autolyse der Zellen, freigesetzt; sie lassen sich jedoch in etwa 4-fach höherer Ausbeute durch Induktion mit UV oder Mito-mycin C auch in der Wuchsphase freisetzen. Durch Zentrifugation im CsCl-Gradienten lassen sich die Phagen anreichern, jedoch geht die genetische Aktivität hierbei weitgehend verloren. Bei der Anreicherung und Reinigung im Sucrose-Gradienten erhält man ausgeprägte Maxima genetischer Aktivität.

Es ist nicht gelungen, unter 88 verschiedenen Stämmen von R. lupini Wirtsmutanten zu finden, in denen sich Phagenvermehrung durch Bildung von Plaques oder Hemmhöfen bemerkbar macht, wie in allen anderen bisher bekannten transduzierenden Systemen. Der Phage ϕ -1 konnte also nur durch seine transduzierende Aktivität nachgewiesen werden, dieser verdanken wir seine Entdeckung.

Damit ist die Frage nach dem molekularen Status der Phageninformation in der lysogenen Donorzelle gestellt.

Offenbar ist diese defekt lysogen (7), da ein lytischer Zyklus durch Plaque-Bildung nicht eintritt, auch nicht nach Induktion. Es muß also das Ziel weiterer Untersuchungen sein, Aufschluß über die DNA der nach Induktion freigesetzten Phagenpartikel zu erhalten: Ist sie in der Phagenpopulation einheitlich oder heterogen, wie groß ist der Anteil an bakterieller DNA in den einzelnen Partikeln? Aus der Beantwortung dieser Fragen werden sich Rückschlüsse auf die Korrelation zwischen Wirts- und Phagen-DNA ergeben.

Darüber hinaus eröffnet das ϕ -1 System ein weiteres Eindringen in die Genetik der Rhizobien als es durch den Konjugationstransfer alleine bisher möglich war: eine Feinkartierung durch Kotransduktionsanalyse einzelner Genregionen sollte aufgrund des wesentlich besseren Auflösungsvermögens dieses Verfahrens möglich sein. Diese Untersuchungen sind im Hinblick auf die Funktion der Fertilitätsregionen Fc und Fd (10, 11) von ganz besonderem Interesse.

Rhizobien sind die Organismen der symbiontischen Stickstoffbindung in Leguminosen (5). Es ist zu erwarten, daß die genaue Kenntnis des in dieser Arbeit beschriebenen Transduktionssystems zusammen mit Konjugationsanalysen einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung der Genetik dieser Symbiose zu leisten vermag.

Herrn Professor Dr. W. Heumann danke ich für die Überlassung dieses Themas und für seine Betreuung und Unterstützung der Arbeit. Ich danke auch allen Institutsangehörigen, die mich durch anregende Diskussionen und durch wertvolle technische Hilfe unterstützt haben.

Literaturverzeichnis

- (1) Adams, M.H.: "Bacteriophages", Interscience Publ.,
New York 1959
- (2) Balassa, G.: Genetic Transformation of Rhizobium.
A Review of the Work of R. Balassa.
Bact. Rev. 27, 218-241 (1963)
- (3) Bradley, D.E.: Ultrastructure of Bacteriophages
and Bacteriocins.
Bact. Rev. 31, 230-314 (1967)
- (4) Brenner, S., and Horne, R.W.: A negative staining
method for the high resolution electron
microscopy of viruses.
Biochim. Biophys. Acta 34, 103-110 (1959)
- (5) Dixon, R.O.D.: Rhizobia (With Particular Reference
to Relationships With Host Plants).
Ann. Rev. Microbiol. 23, 137-158 (1969)
- (6) Gabor, M.: Transformation of streptomycin markers in
rough strains of Rhizobium lupini.
II. The relation between the determinant
of streptomycin dependence and those for
streptomycin resistance and sensitiveness.
Genetics 52, 905-913 (1965)
- (7) Garro, A.J., and Marmur, J.: Defective Bacteriophages.
J. Cell. Physiol. 76, 253-262 (1970)
- (8) Hayes, W.: "The Genetics of Bacteria and their Viruses."
2. Ed., Blackwell Scient. Publ.,
Oxford 1968

- (9) Heumann, W.: Conjugation in starforming Rhizobium lupini.
Molec. Gen. Genet. 102, 132-144 (1968)
- (10) Heumann, W., Pühler, A., and Wagner, E.: The Two Transfer Regions of the Rhizobium lupini Conjugation.
I. Fertility Factor Elimination and One Way Transfer.
Molec. Gen. Genet. 113, 308-315 (1971)
- (11) Heumann, W., Pühler, A., and Wagner, E.: The Two Transfer Regions of the Rhizobium lupini Conjugation.
II. Genetic Characterization of the Transferred Chromosomal Segments.
in Vorbereitung (1973)
- (12) Kirby, K.S.: Isolation and Fractionation of Nucleic Acids, in "Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology", ed. by J.N. Davidson and W.E. Cohen, Vol. III, 1964
- (13) Kowalski, M.: Transducing Phages of Rhizobium meliloti.
Acta Microbiol. Polon. 2, 109-114 (1970)
- (14) Marmur, J.: A Procedure for the Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Micro-organisms.
J. Molec. Biol. 3, 208-218 (1961)
- (15) Ozeki, H., and Ikeda, H.: Transduction Mechanisms.
Ann. Rev. Genet. 1, 245-278 (1967)
- (16) Rösch, A.: Konjugationsversuche mit einem neu isolierten Rhizobium Stamm und Vergleich seines Transfersystems mit dem von Rhizobium lupini.
Diplom-Arbeit, Univ. Erlangen-Nürnberg 1971

- (17) Valentine, R.C., Shapiro, B.M., and Stadtman, E.R.:
Regulation of Glutamine-Synthetase.
XII. Electron Microscopy of the Enzyme
of E. coli.
Biochemistry 7, 2143-2152 (1968)
- (18) Weigle, J., Meselson, M., and Paigen, K.: Density
Alteration Associated with Transducing
Ability in the Bacteriophage Lambda.
J. Molec. Biol. 1, 379-386 (1959)
- (19) Yamamoto, K.R., Alberts, B.M., Benzinger, R.,
Lawhorne, L., and Treiber, G.: Rapid
Bacteriophage Sedimentation in the
Presence of Polyethylene Glycol and
its Application to Large-Scale
Purification.
Virology 40, 734-744 (1970)
- (20) Zelazna, I.: Transformation in Rhizobium trifolii.
I. Influence of some factors on the
transformation.
Acta Microbiol. Polon. XIII, 283-289 (1964)
- (21) Zelazna-Kowalski, I., and Lorkiewicz, Z.:
Conditions for Genetical Transformation
in Rhizobium meliloti.
Acta Microbiol. Polon. 3, 218-228 (1971)

Lebenslauf

Name: Alfons R ö s c h

Geburtstag: 16. August 1944

Geburtsort: Passau

Eltern: Ludwig Rösch, Oberkontrollassistent und
Frieda Rösch geb. Heydn

Schulen: Sept. 1950 - Juli 1955 Volksschule in
Freyung v.W. / Ndby.
Sept. 1955 - Juli 1964 Oberrealschule Passau
22. Juli 1964 Reifezeugnis der Oberrealschule
Passau

Studium: November 1964 - Februar 1970
Studium der Biologie an der Friedrich-Alexander
Universität Erlangen-Nürnberg
27. Oktober 1967 Diplom-Vorprüfung in Biologie
24. Februar 1970 Diplom-Hauptprüfung in Biologie
9.-30. Sept. 1969 Teilnahme an einem Kurs über
"Molecular Radiobiology" in Saclay/Frankreich,
veranstaltet von EURATOM.

Tätigkeiten: 1.8.69 - 31.5.70 Studentische Hilfskraft am
Institut für Mikrobiologie, Erlangen
1.6.70 - 28.2.71 Technischer Angestellter am
Institut für Mikrobiologie, Erlangen
1.3.71 - 31.3.73 Wissenschaftlicher Mit-
arbeiter am Institut für Mikrobiologie, Erlangen
(Forschungsauftrag der Deutschen Forschungs-
gemeinschaft)
ab 1.4.73 Verwalter einer wissenschaftlichen
Assistentenstelle am Institut für Mikro-
biologie, Erlangen

(Alfons Rösch)

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990